



Determinação de Tiamina em grãos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e derivatização pós-coluna.

Jeane Santos da Rosa; Ronoel Luiz de Oliveira Godoy; João Oiano Neto; Manuela Cristina Pessanha de Araujo; Renata Galhardo Borguini; Sidney Pacheco;

¹Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501 - Guaratiba. Rio de Janeiro, RJ - Brasil - CEP 23020-470. Fone: (21) 3622-9775 - Fax: (21) 3622-9713 – e-mail: jeane@ctaa.embrapa.br.

RESUMO – A determinação de vitaminas em alimentos não fortificados é um desafio analítico, devido ao excesso de interferentes e os baixos níveis destes analitos quimicamente sensíveis. Neste trabalho foram feitas várias adaptações ao método oficial *European Standard* (2003) para análise de tiamina (vitamina B1) em grãos. As modificações consistiram no uso de um regente de pareamento iônico com maior cadeia carbônica e maior concentração, a não utilização de tampão fosfato. A maior retenção foi compensada por uma coluna de dimensões menores, porém de alta eficiência e com capacidade para suportar baixos valores de pH, que permitiu inclusive diminuir em quase a metade o volume de solvente orgânico utilizado. Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura e variaram em torno de 0,2-0,3mg/100g de milho, 0,6-0,9mg/100g de feijão e 0,2-0,3mg/100g de arroz. Os cromatogramas obtidos produziram picos Gaussianos, com boa reprodutibilidade de tempo de retenção (média de 7,5 minutos) e livres de interferentes visualmente próximos.

ABSTRACT – Vitamins determinations in non fortified food are an analytical challenge due interfering presence and low levels of these chemically unstable analytes. In this study we made several adjustments to the official European Standard method (2003) for analysis of thiamin (vitamin B1) in beans. The changes consisted in the use of an ion-pairing reagent with higher carbon chain and higher concentration and the non-use of phosphate buffer. The high retention was compensated by a column of smaller dimensions, but with high efficiency and ability to withstand low pH, which allowed the use of almost half the volume of organic solvent. The results are in agreement with the literature and varied around 0.2-0.3 mg/100g of corn, 0.6-0.9 mg/100g of beans and 0.2-0.3 mg/100g of rice. The chromatograms obtained produced Gaussian peaks with good retention time reproducibility (average of 7.5 minutes) free of interfering visually close.

PALAVRAS-CHAVE: vitamina B1, tiocromo, feijão preto, arroz, milho

KEYWORDS: Vitamin B1, Thiocrome, black beans, rice, corn



1. INTRODUÇÃO

A tiamina é uma substância sulfurada e, sob a forma de pirofosfato, participa como coenzima em vários caminhos metabólicos como ciclo do ácido cítrico, glicólise e produção de pentose fosfato (GOLDA *et al.*, 2004). Está especialmente envolvida em várias etapas do metabolismo dos carboidratos e seu requerimento diário depende dos teores dos carboidratos presentes na dieta (CRAIG *et al.*, 2000).

A determinação de tiamina em alimentos é bastante complexa, pois devido aos baixos níveis torna-se necessário utilizar detectores de fluorescência, mais sensíveis que os usuais detectores de UV ou mesmo arranjo de diodo (PDA).

Em geral métodos aplicáveis para formulações farmacêuticas ou alimentos fortificados não são úteis para dosar vitaminas presentes naturalmente nos alimentos. O mesmo pode ser dito para métodos tipo multianálitos (multivitaminas) que, devido à natureza complexa e estruturas químicas diferentes destas substâncias, produzem picos mal separados e de baixa sensibilidade.

A derivatização pós-coluna com ferricianeto de potássio alcalino (Figura 1) permite a detecção por fluorescência da vitamina B1 sob a forma de tiocromo (GUBLER, 1991). A derivatização pós-coluna garante que a presença de substâncias redutoras como polifenóis, por exemplo, não prejudiquem a conversão oxidativa da tiamina em tiocromo, pois a reação ocorrerá sequencialmente com a vitamina B1 já separada dos interferentes.

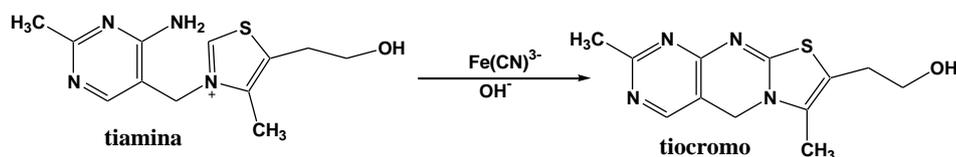


Figura 1: Reação de derivatização da tiamina com ferricianeto de potássio alcalino produzindo o tiocromo um composto fluorescente.

O objetivo deste trabalho foi adaptar o método oficial da *European Standards* para determinação de tiamina em alimentos para amostras de grãos (feijão, arroz e milho).

2. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras estudadas inicialmente foram feijão preto, arroz e milho oriundos de diversos projetos desenvolvidos na Embrapa Agroindústria de Alimentos.

A metodologia em questão foi adaptada a partir do método oficial *European Standard* (2003), que se baseia na extração da vitamina B1 da matriz do grão finamente moído por hidrólise ácida com HCl 0,1M em autoclave a 121°C. Após a hidrólise ácida, a amostra foi resfriada, o pH ajustado à aproximadamente quatro com acetato de sódio 2,5M e foram adicionados 150mg de enzima takadiastase (Sigma-Aldrich®). As amostras foram levadas ao banho termo estático por 18 horas a 37°C, filtradas em papel de filtro e analisadas. Utilizou-se um cromatógrafo líquido Waters Alliance® 2695 previamente calibrado, equipado com filtro de linha, detector de fluorescência Waters® 2475, sistema de reação pós-coluna Waters® à temperatura ambiente, fase móvel isocrática 40:60 metanol:ácido heptanossulfônico 25mM (v/v) e coluna X-Terra® (100x3,2mm, 3,5µm) com filtro de linha.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação desta vitaminas em alimentos consiste basicamente em duas etapas: a extração por hidrólise ácida e hidrólise enzimática e a análise cromatográfica. A hidrólise ácida foi utilizada para inativar as proteínas e liberar a vitamina destas associações, assim como converter boa parte dos polissacarídeos em açúcares solúveis. A hidrólise enzimática permite a

desfosforilação completa da vitamina B1 pela enzima takadiastase (Sigma-Aldrich®), que possui atividade fosfatásica e proteásica (NDAW *et al.*, 2000). O método descrito neste trabalho consistiu de uma modificação do método oficial da *European Standard* (2003). Foi utilizada uma fase móvel com regente de pareamento iônico (ácido heptanossulfônico) em ácido fosfórico (pH=3) com concentração 25mM, que possibilitou a não utilização de soluções tampão. Também foi diminuído o teor de solvente orgânico (metanol) em aproximadamente 50%, o que permitiu, além de uma substancial economia de solvente, uma separação mais eficiente com picos em formato gaussiano e boa resolução, apesar do volume morto agregado ao sistema cromatográfico, devido ao reator (volume nominal de 1mL, além das tubulações). Também não houve aumento de retenção da tiamina (aproximadamente sete minutos), pois utilizou-se uma coluna C₁₈ de 150x4,6mm e 3,5µm de tamanho de partícula.

O sistema de derivatização pós-coluna foi adaptado de um antigo sistema para derivatização de aminoácidos por ninhidrina e ofereceu algumas dificuldades no que diz respeito à sua inércia em relação à solução derivatizante de pH 14. Cuidados extras como lavagem exaustiva com água foram tomados para que bomba e reator não ficassem com esta solução parada em seu interior, mas mesmo assim problemas de corrosão ocorreram. Uma solução foi fazer outra adaptação com uma válvula de troca de solvente, que permite a programação de entrada de água para lavagem do sistema ao final das injeções, que normalmente ocorrem à noite.

Os cromatogramas produzidos demonstraram boa separação cromatográfica e reprodutibilidade de tempo de retenção em relação ao padrão (Figura 3). As curvas de calibração (Figura 4) estabeleceram excelente correlação entre os pontos demonstrando linearidade na faixa de trabalho.

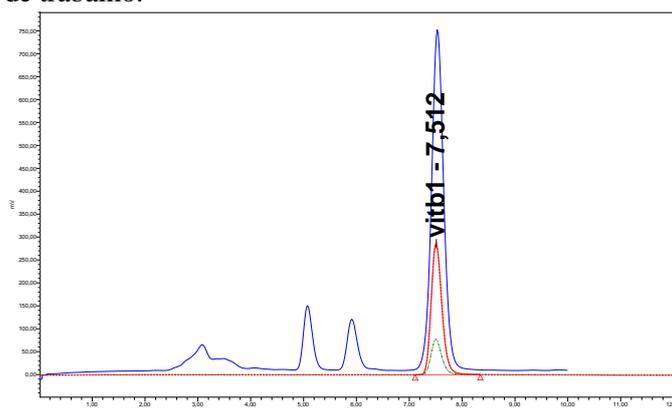


Figura 2: Cromatogramas sobrepostos de dois pontos da curva de calibração e uma amostra de feijão.

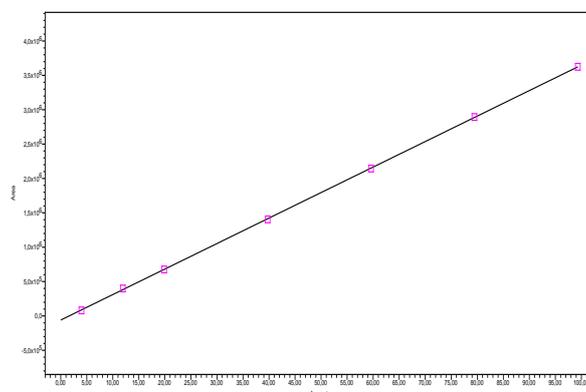


Figura 4: Exemplo de uma curva de calibração obtida ($R^2 = 0,999949$) para a faixa de concentração estudada.



Os níveis de vitamina B1 encontrados estão dentro do reportado em tabelas nutricionais (IBGE/ENDEF, 1999) para feijão, arroz e milho. As variedades e fatores edafoclimáticos associados às amostras não foram levados em consideração para avaliação dos resultados, mas ainda assim observa-se que os resultados descritos na Tabela 1 indicam baixo desvio padrão entre as amostras analisadas.

Tabela 1: Teores de vitamina B1 (mg/100g) encontrados em amostras de arroz, feijão e milho que foram estudadas.

Amostra	Milho	Feijão Preto	Arroz
1.1	0,310	0,869	0,215
1.2	0,340	0,903	0,231
2.1	0,340	0,687	0,210
2.2	0,340	0,669	0,207
3.1	0,250	0,538	0,190
3.2	0,240	0,587	0,214
4.1	0,330	0,619	0,220
4.2	0,360	0,643	0,241
5.1	0,260	0,725	0,243
5.2	0,270	0,722	0,262
6.1	0,340	0,694	0,268
6.2	0,320	0,627	0,261
7.1	0,290	0,601	0,210
7.2	0,290	0,602	0,226
8.1	0,280	0,647	0,151
8.2	0,270	0,618	0,158
9.1	0,260	0,607	0,221
9.2	0,280	0,613	0,213
10.1	0,250	0,605	
10.2	0,250	0,855	
11.1	0,250		
11.2	0,250		
12.1	0,240		
12.2	0,240		
Média	0,285	0,672	0,219
Desv. Pad	0,0393	0,0995	0,0315
CV(%)	13,783	14,821	14,376

4. CONCLUSÕES

O método mostrou-se bastante robusto, adaptando-se bem às modificações realizadas, que permitiram menor tempo de corrida e menor gasto de solventes sem prejudicar a separação cromatográfica.

Os resultados obtidos foram concordantes com os dados de composição descritos na literatura.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CRAIG, I.D.; ASHBY, C.W.; BROWN, I.; CROSBY, N.T.; *et. al.* Determination of thiamine and riboflavin in pet foods and animal feedingstuffs, **ANALYST**, v.125 (2), p.353-360, 2000.

EUROPEAN STANDARD EN14122, **Determination of vitamin B1 by HPLC**, 2003.

GOLDA, A.; SZYNIAROWSKI, P.; OSTROWSKA, K.; KOZIK, A.; RAPALA-KOZIK, M. Thiamine binding and metabolism in germinating seeds of selected cereal and legumes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.42, p.187-195, 2004.

GUBLER, C.J. Thiamin In: MACHLIN, L. J. **Handbook of vitamins**. 1ª ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1991, p. 233-277.

IBGE/ENDEF **Tabelas de Composição de Alimentos**, 5ª ed., 137 p. 1999.

NDAW, S.; BERGAENTZLÉ, M.; AOUDE-WERNER, D.; HASSELMANN, C. Extraction procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and vitamin B6 in foodstuffs. **Food Chemistry**, v.71, p.129-138, 2000.